

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：特定領域研究の計画研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18074005

研究課題名（和文）FoF1-ATP 合成酵素の回転動作機構の解明

研究課題名（英文）Single-molecule study on chemomechanical coupling mechanism of FoF1-ATP synthase

研究代表者

野地 博行 (NOJI HIROYUKI)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：00343111

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：1 分子生理学、生化学

キーワード：回転分子モーター、生体膜、1 分子計測、ナノバイオ、エネルギー変換、MEMS、分子シミュレーション

## 1. 研究計画の概要

- (1) F1 の結晶構造と 1 分子の対応：結晶構造でみられる実質上 1 種類の安定構造と 1 分子計測で観察される 2 つの安定構造の関係を明らかにする。
- (2) F1 の触媒反応と回転スキーム：加水分解後のリン酸の解離するタイミングを決定する。
- (3) F1 の ATP 加水分解に関する量子化学計算結果の 1 分子実験による検証：京都大学で実施されている量子化学計算で示唆されているプロトン転移律速説を実験的に検証する。
- (4) F1 の触媒反応の回転角度依存性：ATP 結合と加水分解の角度依存性の決定
- (5) 新しい膜タンパク質 1 分子計測実験：Fo モーター回転計測のための実験システムを構築する。
- (6) マイクロデバイスの開発：超微小溶液チャンバーを開発し 1 分子計測に応用する。

## 2. 研究の進捗状況

- (1) F1 の結晶構造と 1 分子の対応：1 分子計測中に結晶構造で観察される回転子と固定子の接触点をクロスリンクし、その時の停止角度が回転の「加水分解待ち角度」と対応することから、結晶構造は「ATP 加水分解前後の構造」であることを立証した (PNAS2008 発表済み)。
- (2) F1 の触媒反応と回転スキーム：リン酸アナログであるチオリン酸を溶液に添加して F1 を逆回転することで溶液中には

存在しない ATP  $\gamma$ S を作らせた。その合成確率の角度依存性からチオリン酸が結合する角度が 240-320 度であることが見えている。

- (3) F1 の ATP 加水分解に関する量子化学計算結果の 1 分子実験による検証：1 分子回転における重水の同位体効果をみることで、プロトン転移律速説を実験的に証明した (投稿論文準備中)
- (4) F1 の触媒反応の回転角度依存性：ATP 結合と加水分解の角度依存性を決定し、結合の依存性が非常に強いことを確認した (投稿準備中)。
- (5) 新しい膜タンパク質 1 分子計測実験：プロトン透過路の変異体を作成したところ、世界で初めて Fo の 36 度ステップを発見した。
- (6) マイクロデバイスの開発：基板表面に親水疎水マイクロバターンを作成することで、ドロブレット型チャンバーの作成に成功した。

## 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由) 各研究計画、いずれも計画通りに進んでいることに加え、予想外の発見による成果 (たとえば項目 (5) や (6)) が上がっているため。

## 4. 今後の研究の推進方策

- (1) F1 の結晶構造と 1 分子の対応：終了。
- (2) F1 の触媒反応と回転スキーム：現状のま

ま推進。

- (3) F1 の ATP 加水分解に関する量子化学計算結果の 1 分子実験による検証：論文投稿予定。
- (4) F1 の触媒反応の回転角度依存性：磁気ピンセットで制御する際、ビーズの角度と F1 の角度のずれを求める。
- (5) 新しい膜タンパク質 1 分子計測実験：36 度ステップが溶液条件にどのように依存するのかを検証する。
- (6) マイクロデバイスの開発：開発されたドロプレットタイプのチャンバーを用いて 1 分子計測できることを検証する。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Okuno D, Fujisawa R, Iino R, Hirono-Hara Y, Imamura H, Noji H, Correlation between the conformational states of F1-ATPase as determined from its crystal structure and single-molecule rotation, Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A, 105, 20722-20727、2008、有
- ② Matsumoto S, Yamaguchi S, Ueno S, Komatsu H, Ikeda M, Ishizuka K, Iko Y, Tabata KV, Aoki H, Ito S, Noji H, Hamachi I, Photo gel-sol/sol-gel transition and its patterning of a supramolecular hydrogel as stimuli-responsive biomaterials. Chemistry, 14(13)、3977-3986、2008、有
- ③ Lam L, Sakakihara S, Ishizuka K, Takeuchi S, Arata HF, Fujita H, Noji H Loop-mediated isothermal amplification of a single DNA molecule in polyacrylamide gel-based microchamber, Biomed Microdevices, 10(4)、539-546、2008、有
- ④ Watanabe R, Iino R, Shimabukuro K, Yoshida M, Noji H, Temperature-sensitive reaction intermediate of F1-ATPase. EMBO Rep, 9(1)、84-90、2008、有
- ⑤ Le Pioufle B, Suzuki H, Tabata KV, Noji H, Takeuchi S, Lipid bilayer microarray for parallel recording of transmembrane ion currents, Anal Chem 7(12)、1738-1745、2008、有

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① Single molecule biophysics of F1-ATPase: Mechanical modulation of reaction rate constants and equilibrium constants by F1-ATPase, 第 6 回 Asian biophysics Association Symposium, 2009/1/11 HKUST(Hong Kong)
- ② Femtoliter chamber for Single-molecule and single-cell analysis, 第 4 回 I E E E-NE MS 09 2009/1/6 Shinsen(China)

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 野地 博行 丸善  
「超微小溶液チャンバーを利用した 1 分子バイオアッセイ」  
パリティ 2008 年 09 月 1 日 P. 13-18
- ② 金原数、竹内昌治、竹内正之、野地博行  
化学同人「分子マシンに新たな扉が開かれた」最新分子マシン. ナノで働く“高度な機械”を目指して (2008 年) P. 4-14

〔その他〕

ホームページ

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/sm/bio/sanken/>